

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РАЗОБЩАЮЩЕГО БЕЛКА UCP1 В АБДОМИНАЛЬНОМ ЖИРОВОМ ДЕПО АУТБРЕДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ТЕРМОНЕЙТРАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

А.В. Якуненков

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Елсукова Е.И.

ФГБОУ ВО Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева

Россия, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89, 660046

E-mail: dedesterlocke@gmail.com

Разобщающий белок UCP1 – ключевой элемент механизма теплопродукции и основной маркер адипоцитов бурой жировой ткани [5]. Скопления бурого жира локализованы в верхней части туловища и при угрозе гипотермии обеспечивают подогрев мышц спины, сосудов, собирающих и направляющих кровь в сердце, подогрев сосудов, снабжающих кровью мозг. Недавно UCP1-позитивные клетки, получившие название бежевые адипоциты, были обнаружены в депо белого жира у лабораторных мышей в раннем онтогенезе и при холодовой адаптации взрослых животных [8]. Выяснение происхождения, свойств и функций этих клеток имеет не только фундаментальное значение. Бежевые адипоциты представляют интерес как возможная мишень терапевтических воздействий в медицине, так как именно этот клеточный тип преобладает в термогенной жировой ткани людей [6], причем, как показано в ряде работ, их присутствие сочетается с наиболее оптимальным функционированием жировых депо, с оптимальными для здоровья показателями углеводного обмена [4]. Слабые плохо воспроизводимые термогенные ответы на холод затрудняют понимание функциональной роли этих клеток [2]. Представляет интерес динамика этой клеточной популяции у животных в термонеutralных условиях, при которых отсутствует потребность в факультативном термогенезе. Целью работы была идентификация основного маркера термогенных адипоцитов – белка UCP1 в окологонадном белом жире аутбредных лабораторных мышей при адаптации к термонеutralным условиям содержания.

Эксперименты проведены на самцах аутбредных мышей ICR (питомник ГНЦ ВБ «Вектор») с соблюдением правил Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Контрольная и опытная группы мышей содержались при температуре 30°C (термонеutralная зона) и 23°C соответственно. Эксперимент продолжался 3 недели, возраст мышей к началу эксперимента составлял 8 нед. Окологонадный жир и межлопаточный бурый жир экстирпировали целиком после декапитации животных. Интенсивность энергообмена тканей оценивали по скорости поглощения O₂ суспензией стандартно измельченных образцов при 37°C [1]. Тканевые гомогенаты готовили в буфере 0,01 М трис-HCl с 1 mM ЭДТА, pH 7,2. Содержание ДНК определяли по результатам спектрофотометрии тканевого гидролизата при 270 и 290 нм [3]. Гидролиз ДНК проводили после предварительной экстракции и удаления свободных нуклеотидов, щелочного гидролиза и удаления рибонуклеотидов [3]. Общий белок определяли по методу Лоури. Белок UCP1 идентифицировали в гомогенате окологонадного жира с помощью Вестерн-блоттинга [1]. ПААГ электрофорез проводили в буферной системе Laemmly с 12,5% рабочим гелем; на трек наносили 60 мкг белка. Электроперенос белка на нитроцеллюлозу (0,2 мкм) проводили полусухим способом [1]. Для выявления полосы UCP1 использовали препараты антител компании Sigma Aldrich (USA): кроличьи антитела против синтетического пептида UCP1 (U6382) и козлиные антитела против IgG кролика, меченые щелочной фосфатазой. Блокирование блота, инкубации с антителами, проявление полосы белка проводили в соответствии с рекомендациями компании Sigma Aldrich (USA). Статистический анализ различий между группами животных выполнен с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

В пробах окологонадного жира и контрольной и опытной групп был идентифицирован белок UCP1. Это однозначно указывает на присутствие адипоцитов бежевого типа в абдоминальном депо даже при термонеutralных условиях. Частота выявления полосы UCP1 на блотах не различалась в обеих группах животных и составляла около 70%. В контрольной группе интенсивность белковой полосы составила 1045±310 у.е./мг ткани (n=7). В группе животных, содержащихся при термонеutralных условиях, этот показатель был ниже на 31% и составил 723 у.е./мг ткани (n=4), но различия с контролем не были статистически достоверны.

Следует также отметить, что эффективность переноса белков при вестерн-блоттинге специально не проверяли. В опытной группе масса окологонадного жира была больше, а его базальный энергообмен

при оценке по скорости потребления кислорода *in vitro*, содержание в нем общего белка, ДНК в расчете на мг ткани были снижены (табл.1). В соответствии с ранее полученными результатами [1], базальный энергообмен, содержание белка и ДНК межлопаточного бурого жира также были ниже в опытной группе (табл. 1).

Таблица 1 - Свойства жировых тканей мышей при разных температурных режимах содержания

Показатели жировых тканей	Окологонадный жир		Межлопаточный жир	
	Контроль, n=11	Опыт, n=6	Контроль, n=11	Опыт, n=6
Масса, мг	372,73±42,02	562,13±58,98	90,80±3,79	114,50±10,15
Масса, %	1,03±0,11	1,50±0,15	0,25±0,01	0,30±0,02
ДНК, мкг/мг	0,19±0,04	0,13±0,03	0,58±0,07	0,22±0,02*
Белок, мкг/мг	32,64±5,91	16,08±1,64*	100,13±8,19	45,53±6,16*
VO ₂ , нмоль/мин·мг	0,17±0,04	0,10±0,01	1,38±0,17	1,22±0,24

Примечание: * $p < 0,05$ – статистическая значимость различий между контрольной и опытной группами

Таким образом, изменения в буром жире при адаптации мышей к термонеutralным условиям в целом согласуются с его термогенной функцией. Согласно распространенным представлениям, бежевые адипоциты отсутствуют в жировых депо взрослых животных; только при холодовой и адренергической стимуляции происходит их рекрутирование путем трансдифференцировки белых адипоцитов [7]. Полученные в работе данные свидетельствуют, что даже в термонеutralных условиях в абдоминальном жировом депо у значительной части половозрелых мышей присутствует резервный пул этих клеток. В перспективе, определение UCP1 в биоптатах жировых тканей позволило бы заранее оценивать их термогенный резерв, чтобы рационально планировать терапевтические воздействия и прогнозировать их результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елсукова Е.И., Мизонова О.В., Медведев Л.Н. Влияние длительного ограничения питания в термонеutralных условиях на бурую жировую ткань лабораторных мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т.159, №5. С.553-556.
2. Елсукова Е.И., Медведев Л.Н. Новый тип термогенных адипоцитов: происхождение, свойства, функции // В мире научных открытий. 2016. №8(80). С. 97-127.
3. Трудолобова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 313–316
4. Bartelt A., Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health // Nat Rev Endocrinol. 2014. Vol.10. P.24-36.
5. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // Physiol. Rev., 2004, vol. 84, no. 1, pp. 277-359.
6. Jespersen N., Larsen T., Peijs L., Daugaard S., Homøe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, Pedersen BK, Møller K, Scheele C. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. // Cell Metab., 2013, 17, pp. 798–805.
7. Kalinovich A, de Jong JM, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning // Biochimie. 2017. Vol. 134. P. 127-137
8. Xue B, Rim J.S., Hogan J.C., Coulter A.A., Koza R.A., Kozak L.P. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat // J. Lipid Res., 2007, vol. 48, pp. 41–51